

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. Februar 2001 (15.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/11059 A1

(51) Internationale Patentklassifikation?: C12N 15/70,  
C07K 19/00, C12N 1/21, A61K 39/395, A61P 35/00

PFREUNDSCHUH, Michael [DE/DE]; Am Merwoog 5,  
D-66424 Homburg/Saar (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02589

(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Trud-  
eringer Strasse 246, D-81825 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
2. August 2000 (02.08.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 37 264.0 6. August 1999 (06.08.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZEN-  
TRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS  
[DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg  
(DE).

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-  
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ARNDT, Michaela  
[DE/DE]; Auf dem Höfchen 44, D-66459 Kirkel-Lim-  
bach (DE). LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von-  
Briesen-Strasse 10, D-69151 Neckargemünd (DE).  
KYPRIYANOV, Sergey [RU/DE]; Furtwänglerstrasse 3,  
D-69121 Heidelberg (DE). KRAUSS, Jürgen [DE/DE];  
Auf dem Höfchen 44, D-66459 Kirkel-Limbach (DE).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: F<sub>V</sub> ANTIBODY CONSTRUCT COMPRISING BINDING SITES FOR A CD16 RECEPTOR AND A CD30 SURFACE PROTEIN

(54) Bezeichnung: F<sub>V</sub>-ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE MIT BINDUNGSSTELLEN FÜR EINEN CD16-REZEPTOR UND EIN CD30-OBERFLÄCHENPROTEIN

(57) Abstract: The concerns F<sub>V</sub> antibody constructs comprising binding sites for a CD16 receptor and a CD30 protein surface, said F<sub>V</sub> antibody constructs being capable of inducing the regression of Hodgkin disease. The invention also concerns DNA's coding for said F<sub>V</sub> antibody constructs, and a method for producing such F<sub>V</sub> antibody constructs and their use.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte mit Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und ein CD30-Oberflächenprotein, wobei sich die F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte eignen, eine Regression von Morbus Hodgkin zu induzieren. Ferner betrifft die Erfindung für solche F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte kodierende DNAs sowie ein Verfahren zur Herstellung der F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte und ihre Verwendung.

WO 01/11059 A1

### F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte

Die vorliegende Erfindung betrifft F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte, die eine Regression von Morbus Hodgkin induzieren können, für solche F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte kodierende DNAs sowie ein Verfahren zur Herstellung der F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte und ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper weisen vier variable Domänen, zwei V<sub>H</sub>- und zwei V<sub>L</sub>-Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer V<sub>H</sub>- und einer V<sub>L</sub>-Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper weisen zwei gleiche Bindungsstellen auf, d.h. sie erkennen ein Antigen und werden daher auch als monospezifisch bezeichnet. Künstliche Antikörper können auch zwei verschiedene Bindungsstellen aufweisen, d.h. sie erkennen dann zwei Antigene und werden entsprechend als bispezifisch bezeichnet. Ein Beispiel solcher Antikörper ist jener, der den FcyIIIA Rezeptor (CD16) von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und das Oberflächenprotein CD30 von Morbus Hodgkin-Zellen erkennt. Mit diesem Antikörper (bimAbHRS-3/A9) können NK-Zellen aktiviert und gegen Morbus Hodgkin-Zellen ausgerichtet werden, wodurch eine Regression von Morbus Hodgkin induziert wird (vgl. Hartmann, F. et al., Blood 89 (1997), 2042). Andererseits hat sich gezeigt, daß bimAbHRS-3/A9 nur schwer herstellbar bzw. reinigungsfähig ist. Darüber hinaus hat sich gezeigt, daß bimAbHRS-3/A9 bei vielen Patienten unerwünschte Immunreaktionen hervorruft.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem eine Regression von Morbus Hodgkin induziert werden kann, wobei vorstehende Nachteile vermieden werden.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patent-

und Prolin (P) und vorzugsweise O - 10 Aminosäuren umfassen kann,

5 (b) eine  $V_H$ -Domäne eines anti-CD30-Antikörpers und eine  $V_L$ -Domäne eines anti-CD16-Antikörpers, wobei die Domänen über vorstehenden Peptidlinker 1 miteinander verbunden sind,

10 wobei die Elemente (a) und (b) über einen Peptidlinker 2 miteinander verbunden sind, der jegliche Aminosäuren, insbesondere Glycin, Serin und Prolin und vorzugsweise 3 - 10 Aminosäuren und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS umfassen kann. Ergänzend wird auf die Patentanmeldung 198 19 846.9 des Anmelders verwiesen.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, die für ein vorstehendes  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt kodiert. Ferner sind Expressions-vektoren, die eine solche DNA enthalten, ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugt wird der Expressionsvektor pKID16-  
20 30 von Fig. 1. Dieser wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 29. Juli 1999 unter DSM 12960 hinterlegt. Desweiteren sind Zellen, die einen vorstehenden Expressionsvektor enthalten, ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung.  
25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

- 30 (a) ein erfindungsgemäßes  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt, und/oder  
(b) einen erfindungsgemäßen Expressionsvektor, sowie  
(c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel, Träger, Kontrollen und Marker.

35 Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt

bereit, das Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und ein CD30-Oberflächenprotein aufweist. Dieses F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt läßt sich in großen Mengen und großer Reinheit herstellen. Auch weist es keine Teile auf, die zu unerwünschten Immunreaktionen bei Patienten führen können. Besonders kennzeichnet sich das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt dadurch, daß es NK-Zellen aktivieren und gegen CD30-Oberflächenproteine exprimierende Zellen, insbesondere Tumorzellen, ganz besonders Morbus Hodgkin- oder Reed-Sternberg Zellen, ausrichten kann, wodurch diese Zellen lysiert werden. Somit eignet sich die vorliegende Erfindung gegen Erkrankungen vorzugehen, bei denen CD30-Oberflächenproteine exprimierende Zellen eine Rolle spielen. Solche Erkrankungen sind z.B. Tumorerkrankungen, insbesondere Morbus Hodgkin.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pKID16-30. Dieser kodiert für zwei einzelkettige F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte, von denen das eine die V<sub>H</sub>-Domäne eines anti-CD16-Antikörpers und die V<sub>L</sub>-Domäne eines anti-CD30-Antikörpers und das andere die V<sub>H</sub>-Domäne eines anti-CD30-Antikörpers und die V<sub>L</sub>-Domäne eines anti-CD16-Antikörpers aufweist. Nach Expression der einzelkettigen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte lagern sich diese aneinander, wodurch ein erfindungsgemäßes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt erhalten wird.

Fig. 2 zeigt eine FACS-Analyse der Bindung eines erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes an CD30<sup>+</sup> L540CY Morbus Hodgkin-Zellen und CD16<sup>+</sup> Granulocyten. Die Tumorzellen und die Granulocyten wurden jeweils mit 20 µg des erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes inkubiert. Die Bindung des F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes wurde mit dem anti-c-myc Antikörper 9E10 und Fluorescein-konjugiertem Ziege-anti-Maus IgG bestimmt. Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen alleine mit 9E10 und Fluorescein-konjugiertem Ziege-

anti-Maus-IgG inkubiert.

Fig. 3 zeigt die cytolytische Aktivität von in peripheren Blutlymphozyten (PBL-Zellen) enthaltenen NK-Zellen (Effektor) gegenüber CD30<sup>+</sup> L540CY Morbus Hodgkin-Zellen (Zielzellen) bei unterschiedlichen Effektor-Zielzellen-Verhältnissen in einem 5h JAM-Test. Ein erfindungsgemäßes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt (•) wurde mit einer Konzentration von 1 µg/ml verabreicht. Als Kontrolle wurde bimAbHRS-3/A9 (▲) (mit einer Konzentration von 4 µg/ml verwendet. Als Negativ- Kontrolle wurden das erfindungsgemäße F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt ohne NK-Zellen (°) und NK-Zellen alleine (□) verwendet.

Fig. 4 zeigt die Behandlung von SCID Mäusen, die Morbus Hodgkin-Xenotransplantate tragen, mit einem erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt. Die Mäuse wurden am Tag 0 i.V. mit 100 µg eines erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes zusammen mit NK-Zellen enthaltenden PBL-Zellen (•) bzw. ohne solche (°), mit 200 µl PBS (\*), mit 1 x 10<sup>7</sup> PBL-Zellen (□), bzw. mit einem Gemisch von 100 µg mAb HRS-3 und A9 zusammen mit PBL-Zellen (◊) behandelt. Tumor-Durchmesser wurden zweimal pro Woche gemessen und das Tumor-Volumen wurde mit folgender Formel berechnet:  $\text{Volumen} = \frac{d^2 \times D \times \pi}{6}$ , wobei d der kleinere und D der größere Tumor-Durchmesser ist.

**Beispiel 1: Konstruktion des erfindungsgemäßen Expressionsvektors pKID16-30**

Die cDNA der V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen eines anti-CD16-Antikörpers mAb A9 wurde einer PCR unterzogen. Hierfür wurden die folgenden Primer verwendet:

VH5', 5-CAGCCGGCCCATGGCGCAGGTC (G) CAGCTGCAGC (G) AG-3 (NcoI);

VH3', 5-CCAGGGGCCAGTGGATAGACAAAGCTTGGGTGTTGTTTT-3 (HindIII);

VL5', 5-AGAGACGCGTACAGGCTGTTGTGACTCAGG-3 (MluI);

VL3', 5-GACTGCGGCGCCGACACTTGGGCTGGCC-3 (NotI).

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt: Ein Zyklus; 5 min bei 94°C, 3 min bei 58°C und 2 min bei 72°C, gefolgt von 30 Zyklen; 80 sec bei 94°C, 80 sec bei 58°C und 2 min bei 72°C bzw. letzteres 10 min im letzten Zyklus. Die PCR-Produkte wurden Gelgereinigt und in den Vektor pCR-Script SK(+) (Stratagene) zur Sequenzierung inseriert. Zur Expression wurde die V<sub>H</sub>-Domäne über NcoI/HindIII und die V<sub>L</sub>-Domäne über MluI/NotI in den Vektor pHOG21 inseriert.

Die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen eines anti-CD30-scFv-Fragmentes wurden einer PCR unterzogen. Hierfür wurden die folgenden Primer verwendet:

5-ATGACCATGATTACGCCAAGC-3

5-AGACAAAGCTTGGGTGTTGTTTTGGCTGAGGAGACGG-3 (HindIII);

5-GGCGGATATCGAGCTCACTCAGTCTCC-3 (EcoRV)

5-TATAGCGGCCGCGACATCAGCCCGTTTGATTTC-3 (NotI).

Die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen des anti-CD30-scFv-Fragmentes bzw. des anti-CD16-scFv-Fragmentes wurden in den Expressionsvektor pKID inseriert, wodurch der erfindungsgemäße Expressionsvektor pKID 16-30 erhalten wurde. Dieser kodiert für die einzelkettigen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte V<sub>H</sub> 16-V<sub>L</sub> 30 und V<sub>H</sub> 30-V<sub>L</sub> 16.

**Beispiel 2: Expression des erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes in Bakterien**

E.coli-X11 Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit dem Expressionsplasmid pKID16-30 transformiert worden waren, wur-

den über Nacht in 2YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glucose bei 37°C gezüchtet. 1:20-Verdünnungen der über Nacht-Kulturen wurden als Kolbenkulturen in 2YT-Medium bei 38°C unter Schütteln mit 280 rpm gezüchtet. Bei einem OD<sub>600</sub>-Wert von 0,8 wurden die Bakterien durch 10 minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2YT-Mediums, das 100 µg/ml Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde mit einer Endkonzentration von 0,1 M zugesetzt und das Wachstum wurde bei 21°C (20-22°C) 18-20 h fortgesetzt. Das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt wurde wie in Kipriyanov, S.M. et al., Protein Engineering 10, (1997), 445 beschrieben, isoliert. Anschließend wurde es durch eine Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70 % Sättigung) eingeeengt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (30000 g, 4°C, 45 min) gewonnen und in 10 % des Anfangsvolumens von 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographie (IMAC) wurde wie in Kipriyanov, S.M. et al., J. Immunol. Methods 200, (1997), 69 beschrieben, durchgeführt. Das gereinigte F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt wurde gegen eine Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung dialysiert.

### **Beispiel 3: Charakterisierung des erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes**

#### **(A) Durchflußcytometrie**

Zum Nachweis der Bindung eines erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes an CD16<sup>+</sup> Granulocyten und CD30<sup>+</sup> L540CY-Morbus Hodgkin-Zellen wurde eine FACScan (Beckton Dickinson)-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden 1 x 10<sup>6</sup>-Zellen zweimal in eiskaltem PBS-N (PBS, 0,05% NaN<sub>3</sub>) gewaschen und mit 100 µl des F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes von Beispiel 2 45 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 5 min mit 1200 rpm bei 4°C pelletiert und mit 2 ml PBS-N gewaschen. Die Zellen wurden in 100 µl PBS-N, das 10 µg/ml des an das c-myc bindenden Antikörpers 9E10 (ICI Chemikalien) enthielt, resuspendiert und 30 min auf Eis inku-

biert. Die Zellen wurden pelletiert und wie vorstehend gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Fluorescein-markiertem Ziege-anti-Maus IgG (Gibco BRL; 1:100 verdünnt in PBS-N), resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-N waren die Zellen für die Analyse mit PBS-N, das 1  $\mu\text{g/ml}$  Propidiumjodid (Sigma) enthielt, bereit. Hintergrund-Fluoreszenz wurde bestimmt, indem die Zellen mit dem Antikörper 9E10 und Fluorescein-markiertem Ziege-anti-Maus-IgG unter gleichen Bedingungen inkubiert wurden.

Es zeigte sich, daß das erfindungsgemäße  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt sowohl  $\text{CD16}^+$  Granulocyten als auch  $\text{CD30}^+$  L540 CY Morbus Hodgkin-Zellen erkennt und an sie bindet.

#### **(B) Cytotoxizitätstest**

Zum Nachweis der Aktivität eines erfindungsgemäßen  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes NK-Zellen zu aktivieren,  $\text{CD30}^+$  L540CY Morbus Hodgkin-Zellen zu lysieren wurde ein Cytotoxizitätstest entsprechend des in Matzinger, P., J. Immunol. Meth. 145 (1991), 185 beschriebenen JAM-Tests durchgeführt. In dem Cytotoxizitätstest wird die DNA-Fragmentierung bewertet. Zellen wurden mit [ $^3\text{H}$ ] Thymidin bis zu einer Endkonzentration von 2,5-5  $\mu\text{Ci/ml}$  für 4-6 h markiert. Die Zellen wurden pelletiert, einmal mit Kulturmedium gewaschen und auf  $10^4$  Zellen/Vertiefung einer 96-Lochplatte eingestellt. Nach Zugabe von Effektor-Zellen (NK Zellen enthaltende periphere Blutzellen "PBL-Zellen") in verschiedenen Verdünnungen wurde die 96-Lochplatte in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5 %  $\text{CO}_2$  für 4 h inkubiert. Die Zellen und das Medium wurden auf Fiberglas-Filter gesaugt. Nach Waschen und Trocknen der Filter wurden sie in Plastik-Tüten überführt, die eine Szintillationsflüssigkeit enthielten und unter Verwendung eines Flüssig-Szintillations-Zählers (LKB) gezählt. Die gemessene Radioaktivität bezieht sich auf intakte DNA, da DNA aus toten Zellen in kleine Fragmente abgebaut ist, die nicht von den Filtern festgehalten werden. Zur Bestimmung der Cytotoxizität, d.h. der Abtötung von Zellen, wurde die Standardformel für den JAM-Test verwendet: % spezi-



fische Abtötung =  $(S-E)/S \cdot 100$ , wobei E = experimentell erhaltene DNA in Gegenwart von Effektor-Zellen (in cpm) und S = erhaltene DNA in Abwesenheit von Effektor-Zellen (spontan).

- 5 Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt NK-Zellen aktivieren kann, CD30<sup>+</sup> L540CY Morbus Hodgkin-Zellen zu lysieren, wobei die Lyse stärker ist als bei Verwendung von bimAbHRS-3/A9.

10 **(C) Einfluß auf Tumoren von Mäusen**

- CD30<sup>+</sup> L540CY Hodgkin's Lymphome wurden in SCID Mäusen, wie in Hombach, A. et al., Int. J. Cancer 55, (1993), 830; Renner, C. et al., J. Hematotherapy 4, (1995), 447 beschrieben, etabliert. Hierzu wurden  $1.5 \times 10^7$  Tumorzellen in 200  $\mu$ l PBS subcutan in die rechte Flanke der Mäuse injiziert. Die Tumor-Entwicklung, d.h. der Tumor-Durchmesser, wurde zweimal pro Woche bestimmt. Mäuse mit Tumoren von 4-6 mm im Durchmesser wurden in verschiedene Gruppen eingeteilt und erhielten ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt in 200  $\mu$ l PBS zusammen mit NK-Zellen enthaltenden peripheren Blutlymphozyten (PBL-Zellen). Das Tumolvolumen und seine Entwicklung wurden bestimmt (vgl. Legende zu Fig. 4).

- 25 Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt nicht nur in vitro sondern auch in vivo NK-Zellen aktivieren kann, CD30<sup>+</sup> L540CY Morbus Hodgkin-Zellen zu lysieren.

**Patentansprüche**

- 5 1. F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt mit Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und ein CD30-Oberflächenprotein.
2. F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei der CD16-Rezeptor von NK-Zellen stammt.
- 10 3. F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1 oder 2, wobei das CD30-Oberflächenprotein von Morbus Hodgkin- oder Reed-Sternberg-Zellen stammt.
- 15 4. F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 - 3, wobei jeweils eine Bindungsstelle vorliegt.
5. F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, kodiert durch den Expressionsvektor pKID16-30 (DSM 12960).
- 20 6. F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei jeweils zwei Bindungsstellen vorliegen.
7. Expressionsvektor, kodierend für das F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 - 6.
- 25 8. Expressionsvektor nach Anspruch 7, nämlich pKID16-30 (DSM 12960).
9. Transformante, enthaltend den Expressionsvektor nach Anspruch 7 oder 8.
- 30 10. Verfahren zur Herstellung des F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-6, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 9 unter geeigneten Bedingungen.
- 35 11. Kit, umfassend:
  - (a) ein erfindungsgemäßes F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt,

und/oder

- (b) einen erfindungsgemäßen Expressionsvektor, sowie  
(c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel, Träger,  
5                   Kontrollen und Marker,

wobei von den einzelnen Komponenten ein oder mehrere  
Vertreter vorliegen können.

- 10       12. Verwendung des F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes nach einem der  
Ansprüche 1-6 zur Lyse von CD30-Oberflächenproteinen  
exprimierenden Zellen.
- 15       13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Zellen Tumorzellen  
sind.
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Tumorzellen Morbus  
Hodgkin- oder Reed-Sternberg-Zellen sind.

**F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte mit  
Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und ein CD30-Ober-  
flächenprotein, wobei sich die F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte eignen,  
eine Regression von Morbus Hodgkin zu induzieren. Ferner be-  
trifft die Erfindung für solche F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte kodie-  
rende DNAs sowie ein Verfahren zur Herstellung der F<sub>v</sub>-Antikör-  
10 per-Konstrukte und ihre Verwendung.

XhoI AseI  
 1 CTCGAGAGCGGGCAGTGAGCACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTCACCCAGGCTTTACACTTTAT  
 EcoRI RBS  
 79 GCTCCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAAATTAAC  
 PelB leader AlwNI NcoI Serum A  
 157 CATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGCCATGGCGCAGGTGCAGCTG  
 1 MetAlaGlnValGlnLeu  
 VH anti-CD16 EcoRV  
 235 CAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACT  
 7 GlnGlnSerGlyAlaGluLeuValArgProGlyThrSerValLysIleSerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThr  
 CDR-H1 EcoRV CDR-H2  
 313 AACTACTGGCTAGGTTGGGTAAACAGAGGCCTGGACATGGACTCGAGTGGATTGGAGATATCTACCCTGGAGGTGGT  
 33 AsnTyrTrpLeuGlyTrpValLysGlnArgProGlyHisGlyLeuGluTrpIleGlyAspIleTyrProGlyGlyGly  
 391 TATACTAACTACAATGAGAAATTCAGGGCAAGGCCACAGTGAAGTGCAGACACATCCTCCAGAATCGCTACGTGCAG  
 59 TyrThrAsnTyrAsnGluLysPheLysGlyLysAlaThrValThrAlaAspThrSerSerArgThrAlaTyrValGln  
 CDR-H3  
 469 GTCAGGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTGCAAGATCGGCTAGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGC  
 85 ValArgSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrPheCysAlaArgSerAlaSerTrpTyrPheAspValTrpGly  
 CH1 HindIII Linker EcoRV  
 547 GCACGGACTACGGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCAAGCTTGGCGGTGATATCGAGCTCACTCAGTCTCCA  
 111 AlaArgThrThrValThrSerSerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGlyAspIleGluLeuThrGlnSerPro  
 VL anti-CD30  
 625 AAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAACGTCACCTACAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCC  
 137 LysPheMetSerThrSerValGlyAspArgValAsnValThrTyrLysAlaSerGlnAsnValGlyThrAsnValAla  
 703 TGGTTTCAACAAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGTTCTGATTTACTCGGCATCTTACCGATACAGTGGAGTCCCTGAT  
 163 TrpPheGlnGlnLysProGlyGlnSerProLysValLeuIleTyrSerAlaSerTyrArgTyrSerGlyValProAsp  
 781 CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTAT  
 189 ArgPheThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerAsnValGlnSerGluAspLeuAlaGluTyr  
 C kappa NotI  
 859 TTCTGTCAGCAATATCACACCTATCCTCTCACGTTCCGAGGGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCG  
 215 PheCysGlnGlnTyrHisThrTyrProLeuThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleLysArgAlaAspAlaAla  
 BamHI c-myc epitope His6 tail BglII  
 937 GCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAAAGATCTATT  
 241 AlaAlaGlySerGluGlnLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHisHisHis  
 RBS Pel B leader NcoI  
 1015 AAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCC  
 NcoI Serum A VH anti-CD30  
 1093 ATGGCGGCCATGGCCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCAGGGGCTGAGCTGGCTAGACCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCC  
 1 MetAlaGlnValGlnLeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysMetSer  
 1171 TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTACCTACACAATACACTGGGTAAAGACAGAGGCCTGGACACGATCTGGAATGG  
 24 CysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrThrTyrThrIleHisTrpValArgGlnArgProGlyHisAspLeuGluTrp  
 1249 ATTGGATACATTAATCTAGCAGTGGATATTCTGACTACAATCAGAACTTCAAGGGCAAGACCACATTGACTGCAGAC  
 50 IleGlyTyrIleAsnProSerSerGlyTyrSerAspTyrAsnGlnAsnPheLysGlyLysThrThrLeuThrAlaAsp  
 1327 AAGTCTCCACACAGCCTACATGCAACTGAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAGA  
 76 LysSerSerAsnThrAlaTyrMetGlnLeuAsnSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaArgArg  
 CH1  
 1405 GCGGACTATGGTAACTACGAATATACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAACGCTCTCCTCAGCCAAA  
 102 AlaAspTyrGlyAsnTyrGluTyrThrTrpPheAlaTyrTrpGlyGlnGlyThrThrValThrValSerSerAlaLys  
 HindIII Linker EcoRV VL anti-CD16  
 1483 ACAACACCCAAGCTTGGCGGTGATATCCAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAAC  
 128 ThrThrProLysLeuGlyGlyAspIleGlnAlaValValThrGlnGluSerAlaLeuThrThrSerProGlyGluThr  
 CDR-L1  
 1560 AGTCACACTCACTTGTGCGCTCAAATACTGGGACTGTTACAACCTAGTAACTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAACCAGA  
 153 rValThrLeuThrCysArgSerAsnThrGlyThrValThrThrSerAsnTyrAlaAsnTrpValGlnGluLysProAs  
 CDR-L2  
 1638 TCATTTATTCACTGGTCTAATAGGTATACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCTGCCCAGATTCTCAGGCTCCCTGAT  
 179 pHisLeuPheThrGlyLeuIleGlyHisThrAsnAsnArgAlaProGlyValProAlaArgPheSerGlySerLeuIl  
 CDR-L3  
 1716 TGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGGTATAA  
 205 eGlyAspLysAlaAlaLeuThrIleThrGlyAlaGlnThrGluAspGluAlaIleTyrPheCysAlaLeuTrpTyrAs  
 NotI BamHI  
 1794 CAACCATTTGGGTGTTTCGGTGGAGGAACCAAACTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTGCGGCCGCTGGATCCGAACA  
 231 nAsnHisTrpValPheGlyGlyGlyThrLysLeuThrValLeuGlyGlnProLysSerAlaAlaAlaGlySerGluGl

Fig. 1

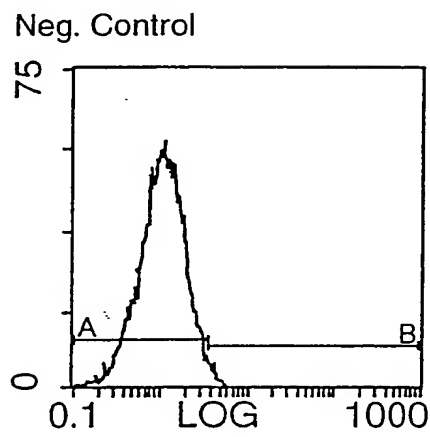
*c-myc epitope* His6 tail XbaI BclI NheI  
 1872 AAAGCTGATCTCAGAAAGAA TAAACTCACATCACCATCACCATCATAAGAGGCCTGTGCTAATGATCAGC  
 257 nLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHisHisHis

HpaI  
 1950 TAGCTTGAGGCATCAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTAAAC  
 Sall Earl PvuI FspI BglI  
 2028 GTCGACCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGA  
 2106 CGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCT  
 NaeI  
 2184 AGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTTCTTCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGG  
 f1 IR DralIII  
 2262 GCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAG  
 2340 TGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAATCTTGTTCAC  
 2418 AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTT  
 SspI  
 2496 AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTT  
 BspHI  
 2574 CGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA  
 SspI Earl  
 2652 CCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTT  
 ApaI  
 2730 TTTGCGGCATTTTGCCCTTCCTGTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGT  
 XmnI  
 2808 GCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCA  
 DraI  
 2886 ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTCCG  
 Scal 1000  
 2964 CGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTA  
 β-Lactamase PvuI  
 3042 AGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCG  
 3120 AAGGAGCTAACCCTTTTTCGACAAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA  
 FspI  
 3198 GCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAA  
 AseI  
 3276 CTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCG  
 BglI BsaI  
 3354 GCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTG  
 3432 GGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGA  
 3510 CAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATGGTAACGTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATT  
 DraI DraI BspHI  
 3588 GATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAA  
 3666 CGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGC  
 3744 GTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTT  
 3822 TTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCAC  
 AlwNI  
 3900 TTCAAGAACTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAG  
 ColE1 2000 ApaI  
 3978 TCGTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTC  
 4056 ACACAGCCCGAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTT  
 4134 CCCGAAGGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGG  
 4212 GGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCA  
 4290 GGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGTCTAC  
 4368 ATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC  
 Earl  
 4446 AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCG  
 AseI BspMI  
 4524 CGTTGGCCGATTCAATATGCAGGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTTCAC

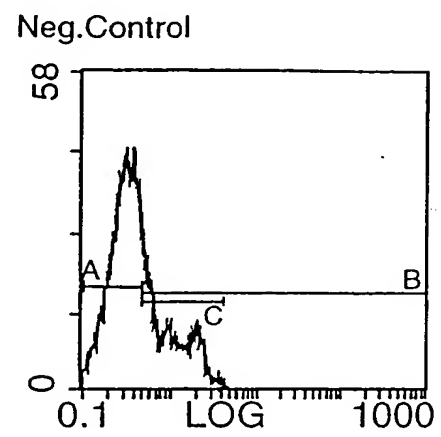
Fig. 1 (Fortsetzung)

Fig. 2

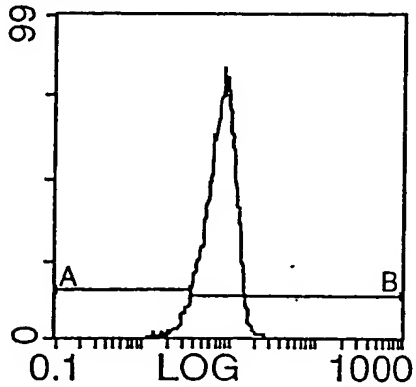
Granulocytes (CD16<sup>+</sup>)



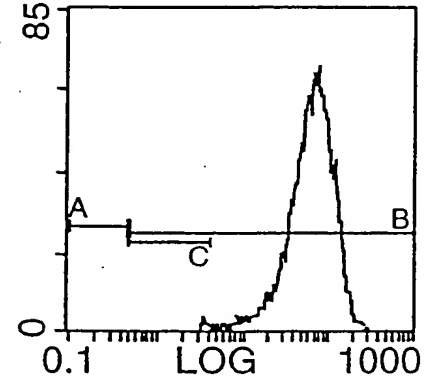
L540CY cells (CD30<sup>+</sup>)



erfindungsgemäßes F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt



erfindungsgemäßes F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt



Fluorescence Intensity

Fig. 3

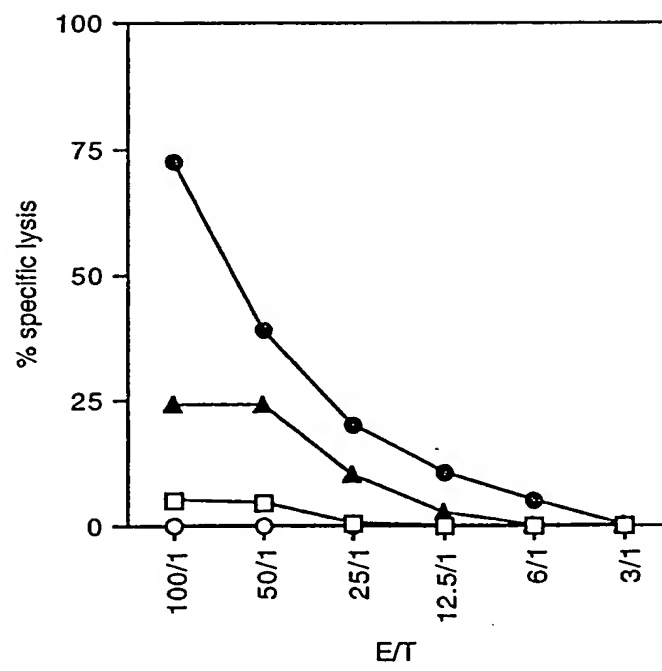
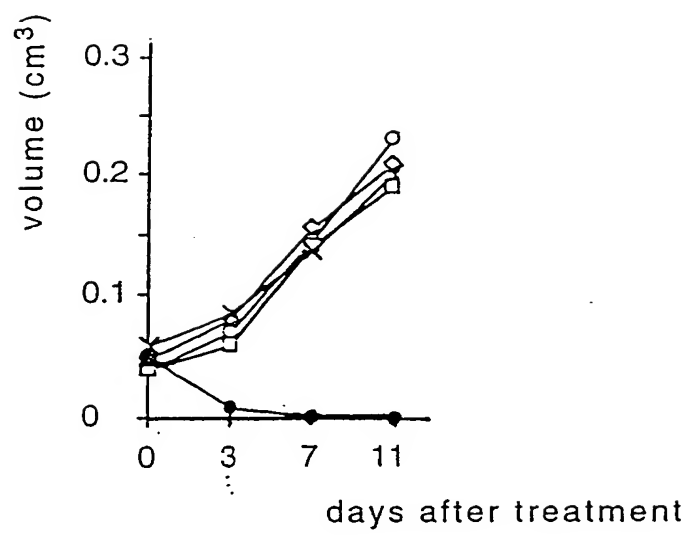




Fig. 4



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

P 00/02589

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/70 C07K19/00 C12N1/21 A61K39/395 A61P35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, STRAND

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 43 37 197 C (BIOTEST PHARMA GMBH) 25. August 1994 (1994-08-25) das ganze Dokument	1-14
Y	S. KIPRIYANOV ET AL.: "Bispecific CD3xCD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cells." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, Bd. 77, Nr. 5, 31. August 1998 (1998-08-31), Seiten 763-772, XP002115487 Basel, die Schweiz Zusammenfassung Abbildungen 1,6 Seite 771, linke Spalte, Zeile 13 -rechte Spalte, Zeile 12	1-14



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. November 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nooij, F

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 195 31 346 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT) 27. Februar 1997 (1997-02-27) Ansprüche 1,3,6-8,13-17,21-24 ---	1-14
A	A. KLIMKA ET AL.: "Making anti-CD30 scFv recombinant antibodies from their hybridomas using phage display technology." ANNALS OF HEMATOLOGY, Bd. 73, Nr. suppl. 2, 1996, Seite A153 XP000653169 Berlin, Deutschland abstract 609 ---	1-14
P,X	M. ARNDT ET AL.: "A bispecific diabody that mediates natural killer cell cytotoxicity against xenotransplanted human Hodgkin's tumors." BLOOD, Bd. 94, Nr. 8, 15. Oktober 1999 (1999-10-15), Seiten 2562-2568, XP002153101 New York, NY, VSA das ganze Dokument ---	1-14
P,X	DE 198 38 967 A (H. ABKEN) 12. August 1999 (1999-08-12) Beispiel 3 -----	1-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/02589

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4337197 C	25-08-1994	EP 0657533 A JP 7246091 A US 5643759 A	14-06-1995 26-09-1995 01-07-1997
DE 19531346 A	27-02-1997	WO 9707819 A EP 0845998 A	06-03-1997 10-06-1998
DE 19838967 A	12-08-1999	WO 9940187 A	12-08-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**